

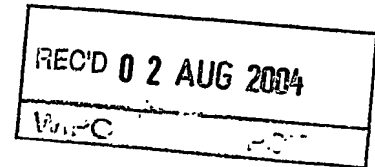
Best Available Copy



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 : 10-2003-0018913
 Application Number



출원 년 월 일 : 2003년 03월 26일
 Date of Application MAR 26, 2003

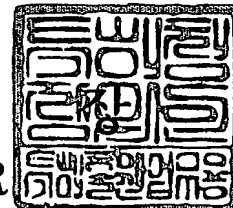
출원 인 : 염규진
 Applicant(s) YUM, KYU-JIN



2004 년 07 월 14 일

특 허 청

COMMISSIONER



PRIORITY DOCUMENT
 SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
 COMPLIANCE WITH
 RULE 17.1(A) OR (B)

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【참조번호】	0001
【제출일자】	2003.03.26
【국제특허분류】	C02F
【발명의 명칭】	유류 및 독성화학물질 분해용 미생물제제
【발명의 영문명칭】	MICROBIAL MATERIALS FOR DEGRADATION OF OIL AND TOXIC CHEMICALS
【출원인】	
【성명】	염규진
【출원인코드】	4-1999-031798-1
【대리인】	
【성명】	박창남
【대리인코드】	9-2001-000437-2
【포괄위임등록번호】	2003-014539-7
【대리인】	
【성명】	진천웅
【대리인코드】	9-1998-000533-6
【포괄위임등록번호】	2000-034569-2
【발명자】	
【성명】	염규진
【출원인코드】	4-1999-031798-1
【발명자】	
【성명의 국문표기】	박영준
【성명의 영문표기】	PARK, Young Jun
【주민등록번호】	730424-1345317
【우편번호】	151-050
【주소】	서울특별시 관악구 봉천동 196-5 관악글든빌 102호
【국적】	KR
【심사청구】	청구

【취지】

특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인

박창남 (인) 대리인

진천웅 (인)

【수수료】

【기본출원료】 11 면 29,000 원

【가산출원료】 0 면 0 원

【우선권주장료】 0 건 0 원

【심사청구료】 5 항 269,000 원

【합계】 298,000 원

【감면사유】 개인 (70%감면)

【감면후 수수료】 89,400 원

【첨부서류】 1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】

【요약】

본 발명은 유류 및 독성화학물질 분해용 미생물제제에 관한 것으로, 유류 및 독성화학물질 분해능을 갖는 미생물, 바람직하게는 트라이코스포론 속(*Trichosporon* spp.), 트라이코스포론 쿠타네움(*Trichosporon cutaneum*) 또는 백색부후균(white-rot fungi) 및 배양여액에 천연 왁스, 합성 왁스, 밀랍, 초 등과 같은 친유성물질 분말과 당류 및 콩분말(soybean flour) 등의 미생물 영양물질이 혼합된 것을 특징으로 하여, 친유성 분말에 의한 유류 또는 독성화학물질과의 흡착면적이 증가됨으로서 난분해성인 오염물질을 효율적으로 빠른 시간내에 분해, 처리시키는 효과가 있다.

【색인어】

유류분해, 독성화학물질, 미생물제제, 친유성, 오염토양

【명세서】

【발명의 명칭】

유류 및 독성화학물질 분해용 미생물제제{MICROBIAL MATERIALS FOR DEGRADATION OF OIL AND TOXIC CHEMICALS}

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- <1> 본 발명은 유류 및 독성화학물질 분해용 미생물제제에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 경유, 휘발유, 등유, 벙커C유 등의 유류와 주요 유류성분인 BTEX 등을 효율적으로 분해, 처리할 수 있는 미생물제제에 관한 것이다.
- <2> 주요 오염물질인 경유, 휘발유, 등유, 벙커C유 등의 유류와 주요 유류성분인 BTEX 등은 그 난분해성과 독성으로 인하여 주변 토양 및 지하수에 심각한 환경문제를 야기시키고 있다.
- <3> 이와 같은 오염물질들을 토양 및 지하수에서 처리하는 기존의 기술로는 물리적, 화학적 방법이 사용되어 왔으나 높은 처리비용 및 토양생태계 파괴라는 측면에서 한계를 나타내고 있다. 따라서 최근에는 오염 토양 및 지하수내에 토착하여 서식하는 미생물들의 자연분해 원리를 이용한 생물학적 정화방법이 하나의 해결책으로 제시되었다. 하지만 유류 및 독성화학물질들의 경우 친유성 혹은 소수성으로 인하여 유류간 응집 및 낮은 용해도로 말미암아 토착미생물에 의한 생분해가 어렵고 정화에 오랜 시간을 소요하는 문제점이 있으며 오염물질의 독성이 높은 경우 토착미생물의 활성화에 악영향을 끼쳐서 전체 처리효율이 매우 낮아지는 단점이 있다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- <4> 본 발명은 상기와 같은 종래의 생물학적 처리방법이 가지는 제반 문제를 해결함으로써 경유, 휘발유, 등유, 벙커C유 등의 유류와 주요 유류성분인 BTEX 등의 난분해성 환경오염물질을 효율적으로 분해, 처리할 수 있는 미생물제제를 제공하고자 함에 그 목적이 있다.
- <5> 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 미생물제제는, 유류 및 독성화학물질 분해능을 갖는 미생물 및 배양여액, 친유성 물질 분말 및 미생물 영양물질이 혼합된 것을 특징으로 하여 이루어진다.
- <6> 상기 미생물은 트라이코스포론 루비에리(*Trichosporon loubieri* Y1-A) 수탁번호(KCTC 18079P), 트라이코스포론 쿠타네움(*Trichosporon cutaneum*) 또는 목재표면에 기생하는 백색부후균(white-rot fungi) 중 어느 하나 이상인 것을 특징으로 한다.
- <7> 상기 친유성 물질 분말은 천연 왁스, 합성 왁스, 밀랍, 초 로 이루어진 군중에서 어느 하나 이상인 것을 특징으로 한다.
- <8> 상기 미생물 영양물질은 당류 및 콩분말(soybean flour)을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- <9> 상기 미생물제제의 혼합비는 상기 미생물 및 배양여액 중량%에 대해 친유성 분말 1 ~ 10 중량%, 당류 0.1 ~ 1 중량% 및 콩가루 0.01 ~ 0.1 중량% 인 것을 특징으로 한다.
- <10> 본 발명의 미생물제제는 친유성이 높은 물질 분말을 미생물제제 제조시 첨가함으로써 분말 표면에 친유성 또는 소수성의 오염물질들이 자연스럽게 흡착되어 결과적으로 생분해가 일어날 수 있는 전체 오염물질의 표면적이 증가됨으로써 미생물과의 접촉면적이 증가되어 난분해성인 오염물질을 효율적으로 빠른 시간내에 분해, 처리하게 된다.

<11> 또한 오염물질이 분말 표면에 흡착된 상태에서 미생물에 의해 분해되기 때문에 독성오염 물질들의 미생물 체내로의 유입이나 균체에 흡착되는 양이 줄어들어 분해 미생물에 대한 독성이 저하되므로 생분해 작용이 안정적으로 유지될 수 있다.

【발명의 구성】

<12> 이하, 본 발명의 미생물제제를 상세히 설명한다.

<13> 본 발명의 미생물제제는 유류 및 독성화학물질 분해능을 갖는 미생물 및 배양여액, 친유성 물질 분말 및 미생물 영양물질이 혼합된 것을 특징으로 한다.

<14> 상기 유류 및 독성화학물질은 경유, 휘발유, 등유, 병커C유 등의 유류와 주요 유류성분인 BTEX(Benzene, Toluene, Ethylbenzene, Xylene) 또는 염화페놀화합물 등으로서 그 난분해성과 독성으로 인하여 주변 토양 및 지하수에 심각한 환경문제를 야기시킨다.

<15> 상기 미생물은 유류 및 독성화학물질 분해능을 가지는 미생물로 알려진 것을 이용하고 바람직하게는 트라이코스포론 속(*Trichosporon* spp.), 트라이코스포론 쿠타네움(*Trichosporon cutaneum*) 또는 목재표면에 기생하는 백색부후균(white-rot fungi) 중 어느 하나 이거나 이들의 혼합 미생물로 이루어진다.

<16> 여기에서, 트라이코스포론 속(*Trichosporon* spp.) 균주는 본 발명자가 신규한 트라이코스포론 루비에리(*Trichosporon loubieri* Y1-A) 수탁번호(KCTC 18079P)인 것이 더욱 바람직하다. 한편 목재표면에 기생하는 백색부후균은(white-rot fungi)은 파네로카에테 속(*Phanerochaete* spp.), 플레우로투스 속(*Phleurotus* spp.) 등이 더욱 바람직하다.

<17> 상기 친유성 물질 분말은 천연 왁스, 합성 왁스, 밀랍, 초 로 이루어진 군중에서 어느 하나 이상인 것을 특징으로 한다. 상기 왁스, 밀랍, 초 등과 같은 친유성 물질 분말은 입자의

크기가 작아 질수록 해당 분말 부피당 표면적이 증가하여 상기 유류 또는 독성화학물질을 쉽게 흡착, 미생물과의 접촉면적을 크게 증가시킴으로써 미생물의 유류 및 독성화학물질 분해, 처리 효율을 극대화 시키게 된다.

<18> 상기 미생물 영양물질은 미생물의 생존능력을 높일 수 있게 하기 위하여 당류를 포함하며, 혐기성 상태 하에서 산소 대신 전자수용체로 작용할 수 있는 천연 영양물질인 콩분말(soybean flour)을 포함하는 것이 바람직하다.

<19> 상기 미생물제제의 혼합비는 상기 미생물 및 배양여액 중량%에 대해 친유성 분말 1 ~ 10 중량%, 당류 0.1 ~ 1 중량% 및 콩가루 0.01 ~ 0.1 중량% 인 것을 특징으로 한다.

<20> 상기 영양물질로는 미생물에 유용한 탄소, 질소, 비타민, 무기이온 등을 포함하는데 탄소원으로는 생분해를 거치지 않고 미생물에 의해 쉽게 이용될 수 있는 글루코오스(Glucose) 또는 덱스트로오즈(Dextrose) 등이 바람직하며, 질소, 비타민, 무기이온과 전자수용체의 공급원으로는 천연물질인 콩가루(Soybean flour) 등을 사용하는 것이 바람직하다.

<21> 이하 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명의 예시일 뿐 본 발명의 범위가 이들 만으로 한정되는 것은 아니다.

<22> [실시예]

<23> ... 트라이코스포론 속 균주 및 백색부후균은 증류수 1ℓ 당 Potato Dextrose Broth를 24g 첨가하여 멸균시켜 만든 영양액에, 감자한천배지에서 미리 배양한 균을 4℃ 이하에서 7일간 저온 처리하여 포자(spore) 형성능을 10^7 spore/ml 이상으로 극대화한 후 여기에 살균수 10ml를 붓고 포자현탁액을 조제하여 상기의 영양액 1ℓ 당 1ml을 접종한다. 영양액에 접종된 미생물은 살균된 10psi 이상의 고압 미세공기가 반응기 하부에서 연속적으로 공급되는 배양기에서 30~

35℃ 로 3~5일간 배양한 후 배양된 균주 및 배양여액에 균주배양액 기준으로 친유성 분말은 1~10%, 글루코우스는 0.1~1%, 콩가루는 0.01~0.1%의 부피비로 혼합하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조될 수 있다.

- <24> 본 발명의 미생물제제는 염소계 유기화합물, 농약류(살충제, 제초제, 살균제), 경유, 등유, 휘발유, 병커C유, BTEX(Benzene, Ethylbenzene, Toluene, Xylene), PAHs(Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) 등에 의해 오염된 토양 및 지하수 정화에 바람직하게 적용된다.
- <25> 본 발명에서는 토양 및 지하수내 수분과 섞이지 못하고 유류 오염층을 따로 형성하고 있거나 토양내 Humic acid 등과 같은 유기물과 흡착되어 있는 유류 및 기타 소수성의 오염물질들이 미생물제제에 포함된 미세한 크기의 친유성 분말이 갖는 높은 친유성 및 소수성(Hydrophobic)에 의하여 분말 표면에 흡착되고 이때 흡착에 의하여 늘어나게 되는 오염물질의 표면적에 의하여 오염물질 분해능이 높은 선발 균주에 의한 분해가 보다 빠르고 쉽게 일어난다.
- <26> 또한 영양물질로 첨가된 천연물질인 콩가루는 선발되어 투입된 균주인 트라이코스포론 속 균주와 백색부후균의 질소 및 비타민 공급원으로 작용할 뿐만 아니라 분해기작이 일어나는 동안 토양내 산소가 고갈되는 경우 최종전자수용체인 질산염 등을 공급하여 임의호기성(Facultative aerobic) 균인 트라이코스포론 속 균주들에 의한 혐기성 분해가 가능하도록 하여 산소공급이 어려운 점토층 및 용존산소 농도가 매우 낮은 지하수내에 포함된 오염물질 처리가 가능하도록 한다.

<27> [실험예]

<28> 1. 오염토양의 제조

<29> 실험실내에서 디젤과 휘발유를 혼합하여 10,000 ppm 농도의 TPH(Total Petroleum Hydrocarbon)용액 2,400ml을 인공조제한 후 105℃ 에서 2시간씩 2회 간헐살균시킨 토양 6,000 ml에 첨가하여 고루 섞어 혼합 후 상온에서 밀폐용기내에서 24시간 정치시켜 오염토양을 최종 적으로 제조하였다.

<30> 위와 같이 준비한 인공토 400ml 씩을 500ml 용량 삼각플라스크에 나누어 담고 적정 토양 수분을 맞추기 위하여 여기에 증류수 50ml 씩을 첨가한 후 밀봉하였다.

<31> 2. 오염토양의 정화

<32> 상기와 같이 준비된 총 15개의 토양시료에 아래와 같은 방법으로 5종류의 처리구를 만들어 각각 3반복씩 수행하였는데 이때 준비된 총 15개의 시료는 밀봉하여 15℃ 에서 2주간 보관 후 각 처리구별로 토양시료를 채취하여 토양오염공정시험방법에 따라 유류를 추출하여 기체크로마토그래피(GC-HP6890, Hewlette Packerd Co., U.S.A)를 사용하여 TPH 농도를 측정하였다. 밀봉된 시료는 2주간 보관시 하루에 한번씩 약 1분간 밀봉된 뚜껑을 열어서 현장과 동일한 간헐적인 공기 순환이 이루어지도록 하였다.

<33> 3. 결과 확인

<34> 이와 같은 방법으로 실험한 결과를 아래 표 1에 나타내었다.

<35> 처리구별 처리방법은

<36> ① 왁스분말 0.01g + Glucose 0.001g + 100 ppm H₂O₂ 0.5ml + 트라이코스포론 속 미생물 배양액 1ml

<37> ② 왁스분말 0.01g + Glucose 0.001g + 100 ppm H₂O₂ 0.5ml

<38> ③ Glucose 0.001g + 100 ppm H₂O₂ 0.5ml + 트라이코스포론 속 미생물배양액 1ml

<39> ④ Glucose 0.001g + 100 ppm H₂O₂ 0.5ml

<40> ⑤ 100 ppm H₂O₂ 0.5ml

<41> 이다.

<42> 표 1은 처리구별에 따른 TPH 처리효율을 나타낸다.

<43> 【표 1】

처리구	①	②	③	④	⑤
TPH 처리효율(%)	95 ±2.3	51 ±1.3	73 ±2.5	31 ±1.2	23 ±0.7

<44> ※평균값 ±표준편차(3반복)

<45> 상기 결과를 볼때 친유성인 왁스분말을 미생물과 함께 처리한 경우 가장 높은 처리효율을 보였으며 미생물을 단독으로 처리한 경우 보다 약 22%의 처리효율 상승을 나타냈다. 따라서 미생물과 함께 처리된 왁스분말이 토양내로 침투하여 그 자체의 친유성으로 인하여 오염유류를 표면으로 흡착시킨 후 증가된 오염물질의 표면적에 의해서 미생물에 의한 생분해가 보다 용이하게 일어난 것으로 판단된다.

【발명의 효과】

<46> 이상에서 살펴 본 바와 같이, 본 발명의 유류 분해용 미생물제제는 다음과 같은 효과가 있다.

<47> (1) 친유성 성분에 의한 미생물제제의 오염유류 분해효과 증대 및 전체 복원소요기간의 단축에 따른 오염 토양 및 지하수 정화비용이 절감된다.

<48> (2) 천연성분의 영양제 사용에 따른 미생물제제 제조 원가가 절감된다.

- <49> (3) 무기이온 및 여러종류의 비타민을 함유한 천연성분 재료 사용에 따른 투입미생물의 증식율과 활성 증대 및 이로 인한 생태계 적응성과 생존력이 증가한다.
- <50> (4) 미생물제제에 포함된 선발미생물에 의한 독성화학물질 분해와 이에 따른 토착 미생물의 활성과 개체수가 증가되어 전체 처리효율이 증가되며 토양생태계 파괴 없이 복원이 가능하다.
- <51> (5) 종래의 토양 및 지하수 처리방법과 연계시 처리효과 상승을 기대할 수 있으며 기존 처리방식의 문제점을 극복할 수 있어서 환경산업상 매우 유용한 발명이다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

유류 및 독성화학물질 분해능을 갖는 미생물 및 배양여액, 친유성 물질 분말 및 미생물 영양물질이 혼합된 미생물제제.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 상기 미생물은 트라이코스포론 루비에리(*Trichosporon loubieri* Y1-A) 수탁번호(KCTC 18079P), 트라이코스포론 쿠타네움(*Trichosporon cutaneum*) 또는 목재표면에 기생하는 백색부후균(white-rot fungi) 중 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 미생물제제.

【청구항 3】

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 친유성 물질 분말은 천연 왁스, 합성 왁스, 밀랍, 초로 이루어진 군중에서 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 미생물제제.

【청구항 4】

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 미생물 영양물질은 당류 및 콩분말(soybean flour)을 포함하는 것을 특징으로 하는 미생물제제.

【청구항 5】

제4항에 있어서, 상기 미생물제제의 혼합비는 상기 미생물 및 배양여액 중량%에 대해 친유성 분말 1 ~ 10 중량%, 당류 0.1 ~ 1 중량% 및 콩가루 0.01 ~ 0.1 중량% 인 것을 특징으로 하는 미생물제제.

【서지사항】

【서류명】	명세서 등 보정서
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003.11.24
【제출인】	
【성명】	염규진
【출원인코드】	4-1999-031798-1
【사건과의 관계】	출원인
【대리인】	
【성명】	사광영
【대리인코드】	9-2003-000452-4
【포괄위임등록번호】	2003-047252-6
【사건의 표시】	
【출원번호】	10-2003-0018913
【출원일자】	2003.03.26
【심사청구일자】	2003.03.26
【발명의 명칭】	유류 및 독성화학물질 분해용 미생물제제
【제출원인】	
【발송번호】	9-5-2003-0366193-18
【발송일자】	2003.09.24
【보정할 서류】	명세서등
【보정할 사항】	
【보정대상항목】	별지와 같음
【보정방법】	별지와 같음
【보정내용】	별지와 같음

-----【취지】----- 특허법시행규칙 제13조·실용신안법시행규칙 제8조의 규정에 의하여 위와 같 이 제출합니다. 대리인 사광영 (인)

【수수료】	
【보정료】	0 원
【추가심사청구료】	0 원
【기타 수수료】	0 원
【합계】	0 원

020030018913

출력 일자: 2004/7/21

【첨부서류】

1. 보정내용을 증명하는 서류_1통

【보정대상항목】 청구항 1

【보정방법】 정정

【보정내용】

유류 및 독성화학물질 분해능을 갖는 트라이코스포론 루비에리(*Trichosporon loubieri* Y1-A) 수탁번호(KCTC 18079P), 트라이코스포론 쿠타네움(*Trichosporon cutaneum*) 또는 목재표면에 기생하는 백색부후균(white-rot fungi) 중 어느 하나 이상인 미생물 및 배양여액과 천연 왁스, 합성 왁스, 밀랍, 초 로 이루어진 군중에서 어느 하나 이상인 친유성 물질 분말 및 미생물 영양물질이 혼합된 미생물제제.

【보정대상항목】 청구항 2

【보정방법】 삭제

【보정대상항목】 청구항 3

【보정방법】 삭제

【보정대상항목】 청구항 4

【보정방법】 정정

【보정내용】

제1항에 있어서, 상기 미생물 영양물질은 당류 및 콩분말(soybean flour)을 포함하는 것을 특징으로 하는 미생물제제.

【보정대상항목】 청구항 5

【보정방법】 정정

【보정내용】

제1항 또는 제4항에 있어서, 상기 미생물제제의 혼합비는 상기 미생물 및 배양
여액 중량%에 대해 친유성 분말 1 ~ 10 중량%, 당류 0.1 ~ 1 중량% 및 콩가루 0.01 ~
0.1 중량% 인 것을 특징으로 하는 미생물제제.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☒ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.